

TIAGO ARTUR DA SILVA

ESTUDO CINÉTICO DO 2,4-DINITROFENIL ETIL FOSFATO
COM ÁCIDO BENZOHIDROXÂMICO

FLORIANÓPOLIS

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ESTUDO CINÉTICO DO 2,4-DINITROFENIL ETIL FOSFATO
COM ÁCIDO BENZOHIDROXÂMICO

Trabalho apresentado à Universidade Federal
de Santa Catarina como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de Bacharel em
Química.

Coordenadora de Estágio: Prof^a. Dra. Inês Maria Costa Brighente

Orientador: Prof. Dr. Faruk Jose Nome Aguilera

TIAGO ARTUR DA SILVA

Florianópolis, Junho de 2008.

*Á minha família, pelo
apoio recebido em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial minha mãe, que sempre me apoiou nos momentos difíceis para que pudesse vencer as dificuldades, que compartilhou comigo de todas as minhas conquistas e nunca fez com que perdesse o rumo.

Agradeço também minhas tias Marli e Rita e minha prima Dayana.

Aos meus amigos e colegas de curso, que compartilharam comigo um período de aprendizagem único, dentro e fora da universidade.

Aos meus colegas dos Laboratórios 203 e 210, por serem compreensivos, pacientes, e por me ensinarem seus conhecimentos. Agradeço, em especial, Jacks Priebe por ter me acompanhado durante o trabalho e também Elisa Orth e Michelle Medeiros que sempre estavam dispostas a ajudar.

Ao professor Faruk Nome, por ser fonte de inspiração, e por sempre solucionar minhas dúvidas. Agradeço também a professora Haidi Fiedler por ter me dado a oportunidade inicial de trabalhar no grupo.

Agradeço às professoras Tereza C. R. de Souza e Iolanda da Cruz Vieira pelo apoio dado em algumas etapas do curso.

A todos os demais professores e funcionários do Departamento de Química da UFSC.

À UFSC, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O estudo das reações de hidrólise dos ésteres fosfóricos tem uma importância muito grande para a compreensão dos mecanismos de hidrólise de moléculas biológicas. Neste trabalho, estudou-se a reação entre o ácido benzohidroxâmico (ABH), um nucleófilo de efeito α , com 2,4-dinitrofenil etil fosfato. O perfil de velocidade em relação ao pH para as reações estudadas mostra que a espécie mais reativa do ABH é a aniônica, reagindo até 10^4 vezes mais rapidamente que a água. Os resultados das reações demonstram um comportamento de primeira ordem, na faixa de concentrações estudada, em relação ao ácido benzohidroxâmico. O efeito isotópico, $k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$, foi de 1,44. Os parâmetros de ativação calculados foram E_a 20,85 kcal mol⁻¹, ΔH^\ddagger 20,26 kcal mol⁻¹, ΔS^\ddagger -9,16 eu e ΔG^\ddagger 23,0 kcal mol⁻¹ sugerindo um estado de transição bimolecular altamente hidratado.

Palavras-chave: éster fosfórico, ácidos hidroxâmicos, catálise.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Ésteres Fosfóricos	1
1.2.	Catálise	4
1.3.	Ácidos hidroxâmicos e o efeito α	6
2	OBJETIVOS	9
	Objetivos Específicos	9
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	10
3.1.	Equipamentos	10
3.2.	Reagentes	10
3.3.	Sínteses	11
3.3.1.	Síntese do 2,4-dinitrofenil etil fosfato (DNPEP)	11
3.3.2.	Síntese do ácido benzohidroxâmico (ABH)	12
3.4.	Medidas cinéticas	12
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1.	Caracterização do ácido benzohidroxâmico	14
4.2.	Estudo cinético	16
4.2.1.	Determinação das constantes de velocidade para a reação do DNPEP e ABH.	17
4.2.2.	Efeito do pH nas reações entre ABH e DNPEP	19
4.2.3.	Efeito isotópico na reação do ABH e DNPEP	21
4.2.4.	Estudo do efeito da temperatura na reação do ABH e DNPEP	22
5	CONCLUSÕES	26
6	REFERÊNCIAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Fórmula estrutural do ATP.</i>	1
Figura 2	<i>Fórmula estrutural do ácido citidílico, um dos nucleotídeos que formam o DNA.</i>	2
Figura 3	<i>Diagrama de energia livre para uma reação hipotética.</i>	4
Figura 4	<i>Exemplos de nucleófilos que apresentam o efeito α.</i>	7
Figura 5	<i>Estrutura molecular do 2,4-dinitrofenil etil fosfato.</i>	11
Figura 6	<i>Espectro de massas do ABH.</i>	14
Figura 7	<i>Curva titulação de uma solução aquosa de 1×10^{-3} M de ABH com KOH 0,1M e $\mu = 1,0$ (KCl) a 25,0 °C.</i>	15
Figura 8	<i>Variação da absorbância em função do comprimento de onda da mistura reacional de $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH em H_2O, $\mu = 1,0$ (KCl) e pH = 10,25 a 25°C.</i>	16
Figura 9	<i>Variação da absorbância em função do tempo em 400 nm da mistura reacional de $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH em H_2O, $\mu = 1,0$ (KCl) e pH 10,25 a 25 °C.</i>	16
Figura 10	<i>Constantes de velocidades observadas em função da concentração de ABH na reação com DNPEP em H_2O, $\mu = 1,0M$ (KCl), pH = 10,25 a 25°C.</i>	18
Figura 11	<i>Gráfico do logaritmo de k_{obs} para a reação de $1,86 \times 10^{-5}$ M DNPEP com 0,05 M ABH em H_2O a 25 °C.</i>	19
Figura 12	<i>Relação entre a constante de velocidade com a temperatura da reação para $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH, $\mu = 1,0$ M (KCl),</i>	22
Figura 13	<i>Variação de $\ln (k_{obs}/T)$ vs $1/T$ para a reação de $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH, $\mu = 1,0$ M (KCl).</i>	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Constantes de velocidades observadas em função da concentração de ABH para a reação em $\text{pH} = 10,25$, $\mu = 1,0$ (KCl) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. _____	17
Tabela 2 Valores de k_0 e k_{ABH} para a reação do ABH com DNPEP em $\text{pH} = 10,25$, $\mu = 1,0$ (KCl) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. _____	18
Tabela 3 Parâmetros obtidos pelo ajuste da curva do gráfico do perfil cinético da reação do ABH com DNPEP em função do pH . _____	21
Tabela 4 Valores de k_{obs} obtidos em H_2O e D_2O , e efeito isotópico ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$) para as reações entre ABH e DNPEP, $1,86 \times 10^{-5}\text{ M}$ de DNPEP com $0,05\text{ M}$ de ABH a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 10,25$ e $\text{pD } 10,25$. _____	22
Tabela 5 Parâmetros de ativação da reação de $1,86 \times 10^{-5}\text{ M}$ de DNPEP e $0,05\text{ M}$ de ABH, $\mu = 1,0$ (KCl). _____	24

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
μ	força iônica
ABH	ácido benzohidroxâmico
ATP	adenosina trifosfato
BDNPP	bis (2,4-dinitrofenil) fosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNP	2,4-dinitrofenolato
DNPEP	2,4-dinitrofenil etil fosfato
E_a	energia de ativação
h	constante de Planck
K	constante de equilíbrio
k	constante de velocidade da reação
k_B	constante de Boltzmann
M	concentração molar (mol L^{-1})
nm	nanômetro
p.f.	ponto de fusão
pD	medida da concentração de íons deutério
pH	medida da concentração de íons hidrogênio
pK	medida da constante de equilíbrio
R	constante universal dos gases
RNA	ácido ribonucléico
ΔG	energia livre
ΔH	entalpia
ΔS	entropia

1 INTRODUÇÃO

1.1. Ésteres Fosfóricos

Os ésteres fosfóricos são numerosos, podendo ser encontrados, sobretudo nos organismos vivos. A participação de ésteres fosfóricos em processos biológicos é essencial. Nos processos de digestão celular, por exemplo, ocorre a formação do trifosfato de adenosina (ATP), o qual é formado pela base nitrogenada adenina, a pentose ribose e três radicais fosfato (**Figura 1**).

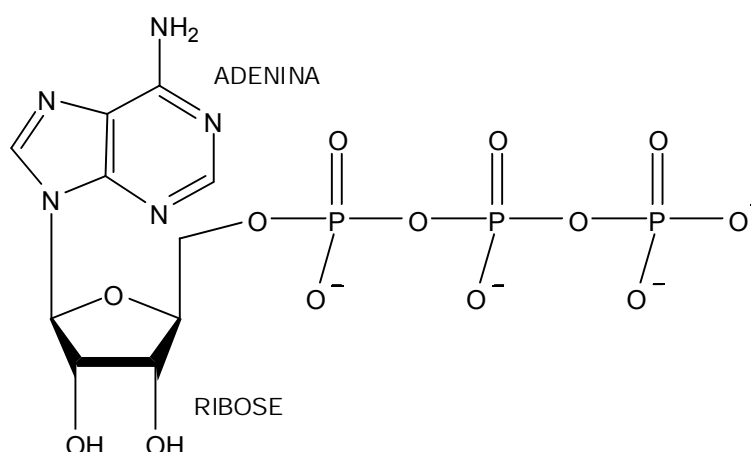


Figura 1 Fórmula estrutural do ATP composta por um grupo adenina, um grupo ribose e três grupos ácido fosfórico.

Toda a informação genética tem em sua estrutura grupos éster de fósforo presentes nos ácidos nucleicos. Os genes são formados por moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA) que ficam agrupados em 23 pares de cromossomos. A função celular é controlada pelo DNA. Cada gene controla automaticamente a formação de outro ácido nucleico, o ácido ribonucleico (RNA), que se difunde por toda a célula, regulando a formação de uma proteína específica, principalmente as enzimas, que catalisam diversas reações químicas na célula, como a formação do ATP¹. A estrutura de um dos nucleotídeos formadores do DNA é apresentada na **Figura 2**.

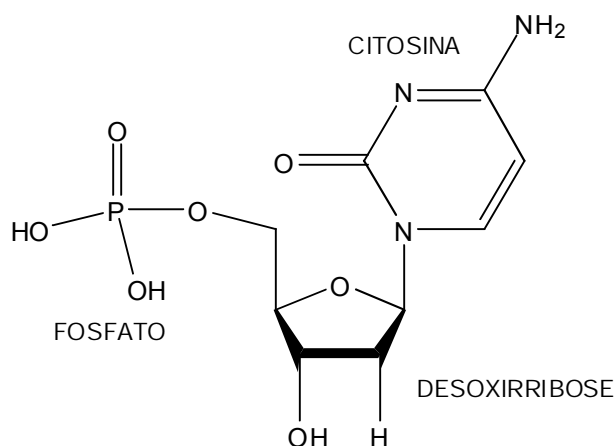


Figura 2 Fórmula estrutural do ácido citidílico, um dos nucleotídeos que formam o DNA. Os nucleotídeos se ligam de tal forma que as moléculas de ácido fosfórico e desoxirribose ficam alternadamente uma após a outra, em cada filamento do DNA.

O estudo de mecanismos de reações envolvendo ésteres fosfóricos tem importância não só no entendimento de processos biológicos, mas também no desenvolvimento de novas tecnologias para aplicação industrial e farmacêutica.^{2, 3} Ainda, os ésteres fosfóricos estão presentes em pesticidas, plásticos e solventes.

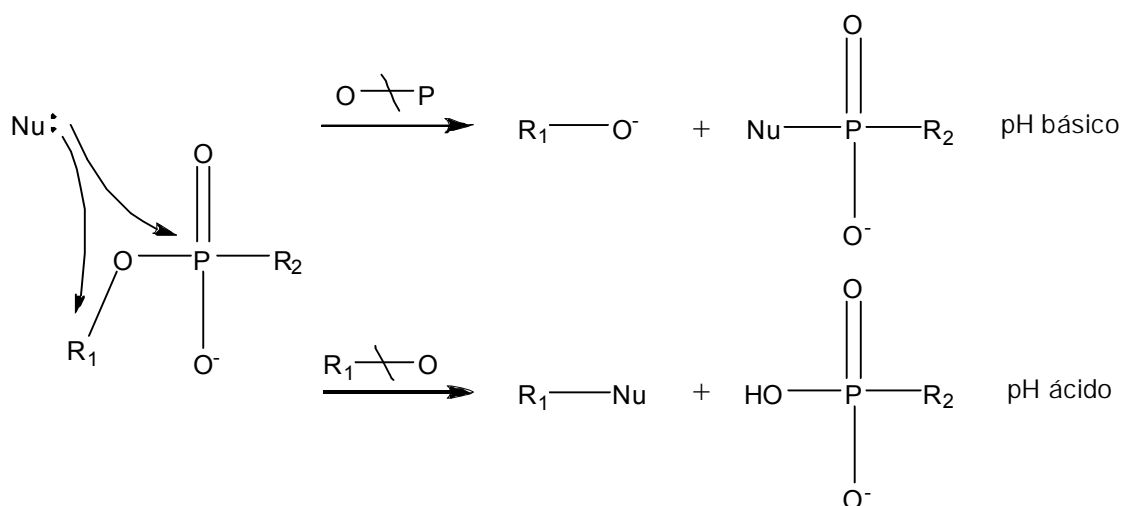
Embora os ésteres fosfóricos estejam envolvidos em diversos processos biológicos vitais, a existência de agentes nervosos de ésteres fosfóricos de grande toxicidade é conhecida⁴. Alguns ésteres são empregados controle de pestes domésticas e na agricultura, mas muitos como armas químicas. A ação tóxica dá-se através da inibição da acetilcolinesterase, enzima que controla a hidrólise da acetilcolina, causada pela fosforilação da serina no sítio ativo da enzima. Isso leva a um aumento descontrolado na concentração de acetilcolina que é um importante neurotransmissor, o que interfere nas respostas musculares, podendo causar falência de órgãos, convulsões e eventualmente, morte.

Como o envenenamento por agentes nervosos pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados, há uma grande preocupação sobre o tratamento dos resíduos gerados com o uso de pesticidas⁵. Os problemas levaram ao desenvolvimento de vários antídotos, entre eles aldoximas de piridina para a remoção nucleofílica do organofosfato.

Diésteres fosfóricos possuem uma alta estabilidade das ligações P-O, por exemplo, o tempo de meia vida para a hidrólise espontânea de alguns diésteres fosfóricos pode exceder décadas.⁶

A classificação dos ésteres de fósforo é feita de acordo com o número de grupos ésteres presentes: monoésteres, diésteres e triésteres. Os monoésteres e diésteres fosfóricos possuem grupos hidroxilas, conferindo-lhes características ácidas.

As reações de substituição nucleofílica em ésteres de ácido fosfórico podem acontecer *via* ataque do nucleófilo ao átomo de carbono ou *via* ataque ao átomo de fósforo. O primeiro mecanismo ocorre preferencialmente em pH ácido, devido a protonação do grupo fosfato, que se torna um melhor grupo de saída. Devido a esse fator, em pH básico o mecanismo predominante é o de ataque ao átomo de fósforo, com saída do grupo alcóxido⁷ (**Esquema 1**).



Esquema 1

As reações de substituição em ésteres fosfóricos com quebra da ligação P-O têm sido descritas por mecanismos associativos e dissociativos⁸. Os mecanismos associativos são semelhantes àqueles para substituição do átomo de carbono em $\text{S}_{\text{N}}2$, formando um intermediário pentacoordenado. O mecanismo dissociativo é semelhante àqueles para processos $\text{S}_{\text{N}}1$, formando o ânion metafosfato, trigonal plano⁹.

1.2. Catálise

Catálise é o aumento da velocidade de uma reação por um composto denominado catalisador, que geralmente não está presente na equação que descreve a reação. Existem dois tipos de catálise: a heterogênea, em que o catalisador está em uma fase diferente do substrato; e a homogênea, em que o catalisador é dissolvido no meio reacional.

As características essenciais de um bom catalisador são: (i) aumento da velocidade da reação; (ii) regenera-se no final da reação, mantendo-se quimicamente inalterado, ainda que em alguns casos possa ser consumido pelos produtos da reação e (iii) não altera as variações de entalpia e de energia livre de equilíbrio da reação.

O catalisador age na etapa lenta de uma reação, promovendo um caminho adicional ao que ocorre em sua ausência. Esse novo caminho tem sua própria lei de velocidade e a velocidade total da reação é a soma das velocidades das reações catalisada e não-catalisada. O novo caminho apresenta uma menor energia livre de ativação comparado a uma reação não catalisada¹⁰ (**Figura 3**).

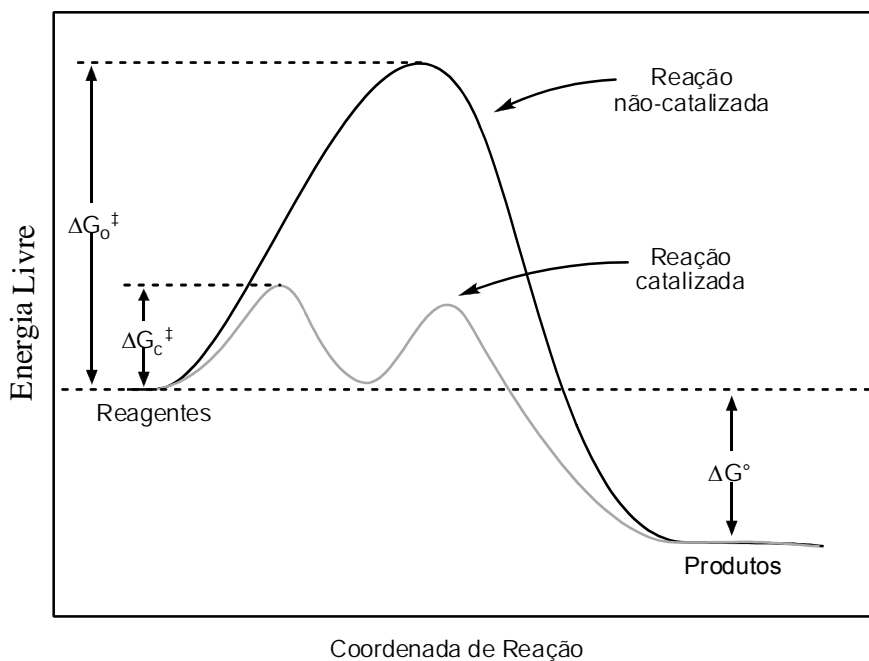
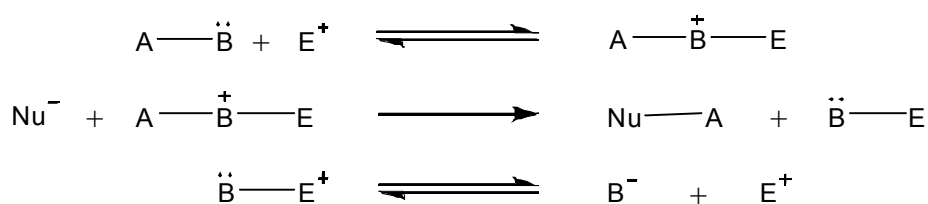


Figura 3 Diagrama de energia livre para uma reação hipotética. ΔG_o^{\ddagger} é a energia livre de ativação da reação na ausência de catalisador e ΔG_c^{\ddagger} é a energia de ativação da reação na presença de catalisador.

As reações de catálise homogênea apresentam várias subdivisões de acordo com o mecanismo de catálise da reação: eletrofílica e nucleofílica, ácida geral e específica e básica geral e específica.¹¹

Na catálise eletrofílica, um cátion ácido de Lewis age complexando com um centro de maior densidade eletrônica, convertendo o grupo em um melhor nucleóforo. O mecanismo generalizado é apresentado no **Esquema 2**. O substrato (A-B) se torna mais eletrofílico através da complexação com um catalisador (E^+) em um pré-equilíbrio.



Esquema 2

A substituição do grupo de saída do substrato por outro mais nucleofílico caracteriza a catálise nucleofílica. Um catalisador age como nucleófilo formando um intermediário mais reativo. A reação ocorre em duas etapas: primeiramente o catalisador reage com o substrato formando um intermediário. Esse por sua vez reage com o nucleófilo restaurando o catalisador. Em catálises nucleofílicas o catalisador deve ser um melhor nucleófilo que o nucleófilo na reação não-catalisada, ser um melhor nucleóforo no intermediário comparado nucleófilo original e o intermediário formado deve ser menos estável que o produto. Em muitas reações que apresentam catálise nucleofílica a detecção de um intermediário pode ser dificultada uma vez que as reações conseqüentes são mais rápidas.

As catálises ácidas e básicas apresentam transferência de próton durante a reação. Se o substrato recebe um próton a catálise é ácida, se o substrato perde um próton retirado por uma base, a catálise é básica.

Os mecanismos de catálise ácida e básica específicas dependem apenas das concentrações dos íons hidrônio e hidróxido. O equilíbrio de protonação dos reagentes é parte importante no estudo do mecanismo específico.

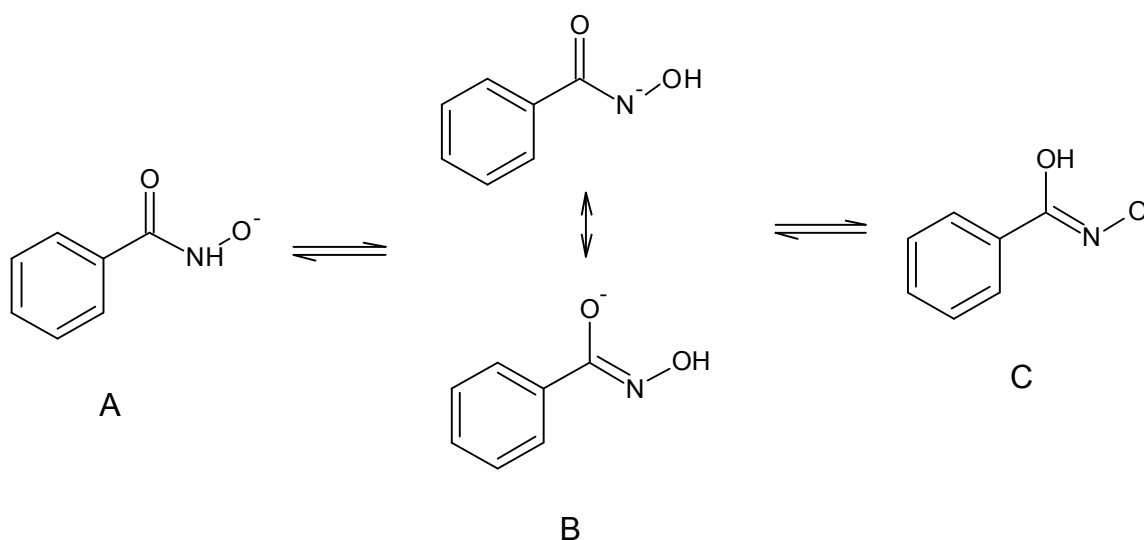
As catálises ácidas e básicas gerais dependem de todas as bases e ácidos conjugados presentes no meio reacional. A velocidade está diretamente ligada à concentração de cada um dos componentes. A etapa determinante nesse tipo de mecanismo é a transferência de próton.

Diversos trabalhos foram publicados na área de catálise de ésteres fosfórico. O mecanismo proposto na maior parte desses trabalhos é o de catálise ácido-base geral e de catálise nucleofílica.^{7,8,12}

1.3. Ácidos hidroxâmicos e o efeito α

Os ácidos hidroxâmicos são um grupo de ácidos orgânicos fracos, encontrados nos tecidos de plantas, fungos e bactérias. São compostos de importância farmacológica e toxicológica. Utilizados como fungicidas, antibióticos e inibidores da lipogenase.

Os ácidos hidroxâmicos podem existir em duas formas tautoméricas: hidroxâmico e hidroxímico (**Esquema 3**)¹³. As formas A e B existem aproximadamente em proporções iguais, a forma C é encontrada em concentrações geralmente 10^{-4} vezes menores em relação às outras formas.¹⁴



Esquema 3

Os ácidos hidroxâmicos são nucleófilos detentores do efeito α , que é definido como o aumento da reatividade de um centro nucleofílico adjacente a um centro com pares de elétrons não-compartilhados¹⁵. Os compostos que apresentam o efeito α apresentam uma reatividade maior que a esperada comparada a nucleófilos com valores de pKa próximos.

Várias classes de compostos apresentam o efeito α , entre elas os ácidos hidroxâmicos. As oximas, hidroxilaminas, hidrazinas e hidrazidas também apresentam o efeito α . A **Figura 4** apresenta as estruturas de alguns compostos que possuem o efeito α .

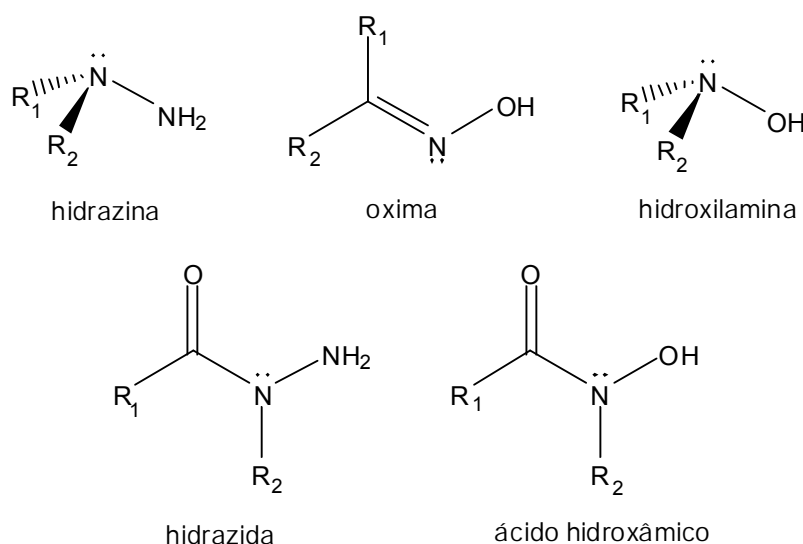
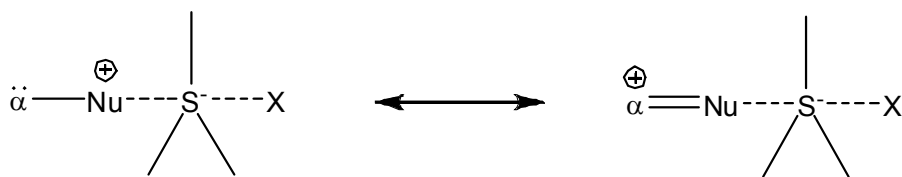


Figura 4 Exemplos de nucleófilos que apresentam o efeito α .

O átomo eletronegativo na posição α ao centro nucleofílico exerce influência para o aumento da nucleofilicidade, aumentando a densidade eletrônica efetiva no centro nucleofílico. No caminho ao estado de transição, a deficiência eletrônica causada pela doação de elétrons do centro nucleofílico é compensada por doação eletrônica α (**Esquema 4**), aumentando a nucleofilicidade.¹⁶



Esquema 4

Portanto há um grande interesse na síntese e aplicação de compostos capazes de apresentar o efeito α . O estudo do efeito desses nucleófilos é importante não só para a catálise de ésteres fosfóricos, como para reações de outros compostos.

2 OBJETIVOS

O estudo da clivagem de ésteres fosfóricos é uma área que tem atraído muito interesse. Ésteres de fósforo estão presentes em diversos processos biológicos, além de se encontrarem entre muitos agentes tóxicos, tais como gases de guerra e pesticidas, que reforçam o interesse no estudo destas reações. Essas reações de transferência do grupo fosforila são extremamente desfavoráveis em solução aquosa, com tempo de meia-vida que pode chegar até 10^7 anos, a 25°C , no caso do dimetil fosfato. Nos sistemas biológicos, essas reações são mediadas por enzimas, com fatores catalíticos de até 10^{17} vezes. Devido à reatividade excepcional exibida pelos ácidos hidroxâmicos, seu efeito na clivagem de ésteres fosfóricos têm sido extensivamente estudado. Nesse sentido, estudou-se nesse trabalho a reação do diéster 2,4-dinitrofenil etil fosfato (DNPEP) com ácido benzohidroxâmico (ABH).

Objetivos Específicos

Para poder conseguir alcançar plenamente o objetivo geral, as estratégias utilizadas neste trabalho são:

- Sintetizar e caracterizar o ácido benzohidroxâmico (ABH);
- Determinar as constantes de velocidade das reações entre DNPEP e ABH utilizando a técnica de espectroscopia no UV-Vis;
- Estudar o efeito isotópico do solvente ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) para as reações entre DNPEP e ABH;
- Avaliar o efeito da temperatura nas reações entre DNPEP e ABH.
- Calcular os parâmetros cinéticos de ativação (ΔH^{\ddagger} , ΔS^{\ddagger} , ΔG^{\ddagger} e E_a)

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Equipamentos

O ponto de fusão do ABH foi determinado em um aparelho de chapa quente tipo FISHER-JOHNS, modelo MQAPF 301 da MICROQUÍMICA sem correção.

As medidas de pH nos procedimentos cinéticos foram realizadas em um pHmetro digital HANNA modelo pH 200, calibrado com soluções padrão pH 4,00; 7,00 e 10,00 (Carlo Erba). As titulações foram feitas em um sistema fechado em atmosfera de N₂ e a base utilizada era livre de carbonatos.

Os espectros de UV/Vis bem como as medidas cinéticas foram obtidos em um espectrofotômetro VARIAN CARY 50, contendo um sistema de aquisição e tratamento de dados cinéticos CARY WINUV v. 3.00. O espectrofotômetro estava acoplado a um banho termostático MICROQUÍMICA modelo MQBTC 99-20. Foram utilizadas celas de quartzo de 3 mL de capacidade e 1 cm de caminho ótico.

A análise de espectrometria de massas foi realizada em um instrumento SHIMATZU GCMS5050A através de injeção direta.

3.2. Reagentes

Com exceção do 2,4-dinitrofenil etil fosfato e do ácido benzohidroxâmico, sintetizados em nosso laboratório, os demais reagentes foram adquiridos comercialmente (Aldrich, Merck, Vetec e Cambridge Isotopes Laboratories) e quando necessário foram purificados previamente.

3.3. Sínteses

3.3.1. Síntese do 2,4-dinitrofenil etil fosfato (DNPEP)

O substrato foi preparado pelo grupo de pesquisa de acordo com o procedimento descrito por Moss e Ihara¹⁷.

Em uma suspensão de 2,4-dinitrofenolato de sódio em benzeno, mantida agitada e resfriada em banho de gelo, adicionaram-se quantidades equivalentes de dimetil fosfocloridrato durante 15 minutos. A mistura foi deixada em refluxo por 12h.

Filtrou-se o precipitado de NaCl da mistura resfriada em banho de gelo e removeu-se o solvente através de pressão reduzida obtendo-se o líquido dietilfosfato de arila. O produto foi dissolvido em acetona seca e adicionado a uma solução de 1 equivalente de LiCl dissolvido no mínimo de acetona seca (aproximadamente 10 g L⁻¹). Após 30 minutos em refluxo, a solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 4 horas antes que o precipitado de 2,4-dinitrofenil etil fosfato de lítio fosse coletado.

Dissolveu-se o sal em água e acidificou-se a solução com HCl concentrado até um pH menor que zero. A solução foi extraída com clorofórmio e as diversas fases orgânicas foram secas e evaporadas a pressão reduzida formando o sólido 2,4-dinitrofenil etil fosfato (**Figura 5**).

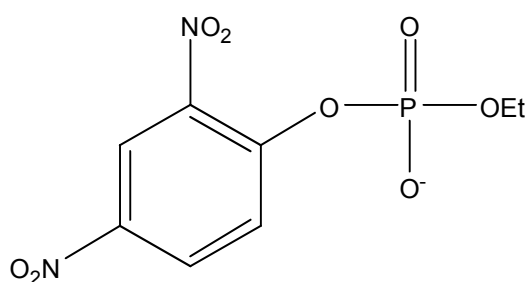
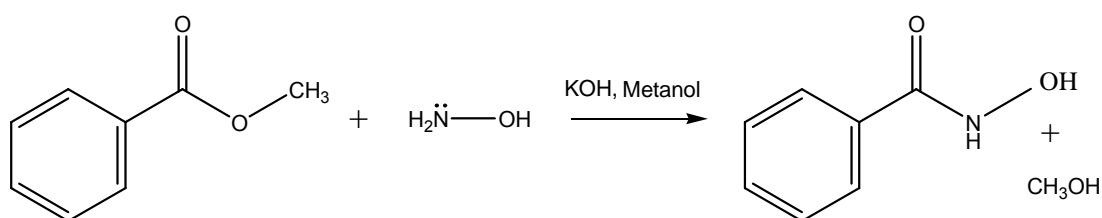


Figura 5 Estrutura molecular do 2,4-dinitrofenil etil fosfato.

3.3.2. Síntese do ácido benzohidroxâmico (ABH)

Em um béquer, dissolveu-se a hidroxilamina (0,210 mol) em 75 mL de metanol a quente. Dissolveu-se o KOH (0,313 mol) em outro béquer com 45 mL de metanol. Adicionou-se a solução de KOH à solução de hidroxilamina aos poucos e deixou-se a solução em banho de gelo por 5 min para precipitar todo KCl.

Ao mesmo béquer, adicionou-se benzoato de metila (0,103 mol), com forte agitação e filtrou-se a solução, lavando o KCl com um pouco de metanol gelado. A solução foi deixada em repouso para formação de cristais, separados por filtração. (Esquema 5)



Esquema 5

Os cristais formados foram dissolvidos em 45 mL de uma solução de ácido acético 1,25 mol L⁻¹ a quente obtendo-se uma solução límpida. A solução de ácido acético foi deixada em repouso em temperatura ambiente por alguns minutos e resfriada, precipitando cristais de ABH. Recristalizou-se em acetato de etila.

A reação apresentou um rendimento de 50% antes da purificação. Apresentou ponto de fusão de 122,2-126,7 °C após a purificação.

3.4. Medidas cinéticas

As cinéticas foram acompanhadas em água por espectrometria UV/Vis adicionando-se 30 µL da solução estoque do substrato DNPEP (1,88 x 10⁻³ mol L⁻¹) em 3 mL da mistura reacional composta por ABH em excesso (0,025-0,100 mol L⁻¹), assegurando condições de pseudo-primeira ordem, com força iônica mantida constante pela adição de KCl (1,0 mol L⁻¹). O pH durante as corridas cinéticas o pH foi mantido constante com o uso dos seguintes tampões: H₂PO₃ (pH 6,50-7,50);

TRIS (pH 7,75-8,25); ABH (8,50-9,50); H₂CO₃ (pH 9,75-11). Para as reações com D₂O o pD foi corrigido de acordo com a **Equação (1)**¹⁸.

$$pD = 0,40 + pH_{lido} \quad (1)$$

As reações foram acompanhadas pela formação do íon 2,4-dinitrofenolato (DNP) em 400 nm. As reações foram seguidas por no mínimo três tempos de meia-vida. As k_{obs} foram calculadas pelo ajuste iterativo dos gráficos lineares de $\ln (A_{\infty}-A_t)$ contra o tempo, sendo que para todas as medidas os coeficientes de correlações (r) foram superiores a 0,999.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do ácido benzohidroxâmico

O ácido benzohidroxâmico (ABH) preparado foi purificado e caracterizado por espectrometria de massas. A **Figura 6** apresenta o espectro obtido.

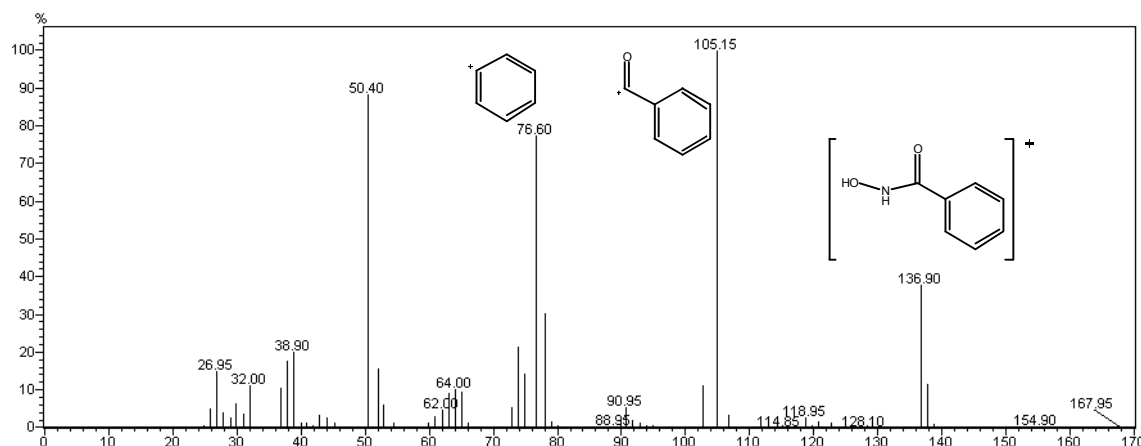
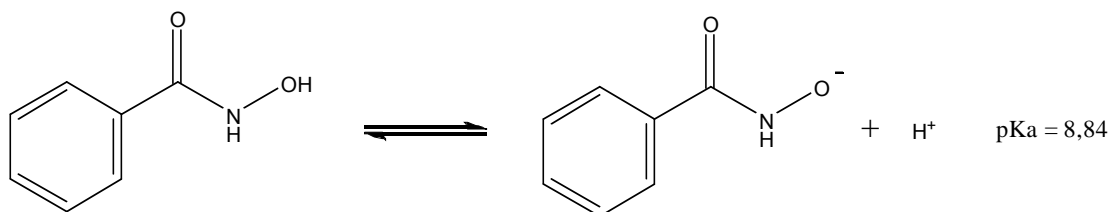


Figura 6 Espectro de massas do ABH.

O pico de m/z 136,9 corresponde ao íon molecular do ABH e os picos de m/z 105,15 e 76,60 são característicos da quebra do produto, sendo o primeiro a quebra da ligação C-N da carbonila e o segundo a quebra da ligação $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}$. A ausência de um pico intenso de m/z 122 característico do ácido benzóico e de um pico de m/z 136 referente ao benzoato de metila, indica pureza do produto.

Foi realizado também a titulação potenciométrica do ABH para avaliar seu equilíbrio de ionização (**Esquema 6**) e assim determinar seu pK_a .



Esquema 6

A **Figura 7** apresenta a curva de titulação obtida com o ABH. Através dela foi possível encontrar o pK_a do ABH em solução de força iônica $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (KCl). O cálculo do pK_a foi baseado no equilíbrio mostrado no **Esquema 6** e ajustado com o programa BEST 7. O valor de pK_a obtido no ajuste foi de 8,84.

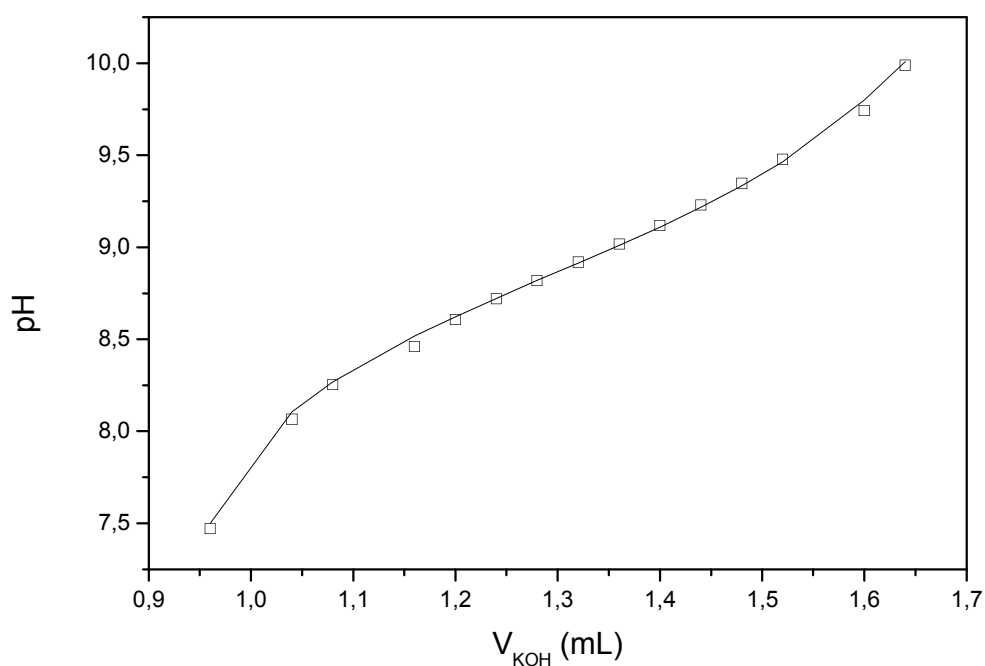


Figura 7 Curva titulação de uma solução aquosa de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de ABH com KOH $0,1 \text{ M}$ e $\mu = 1,0$ (KCl) a $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A linha corresponde ao ajuste teórico dos dados pelo programa BEST7.

4.2. Estudo cinético

A reação foi acompanhada pelo aparecimento do produto fenólico 2,4-dinitrofenolato (DNP) por espectrometria de UV-Vis em 400 nm. Na **Figura 8** são apresentados um conjunto de espectros típicos para a reação do ABH com DNPEP.

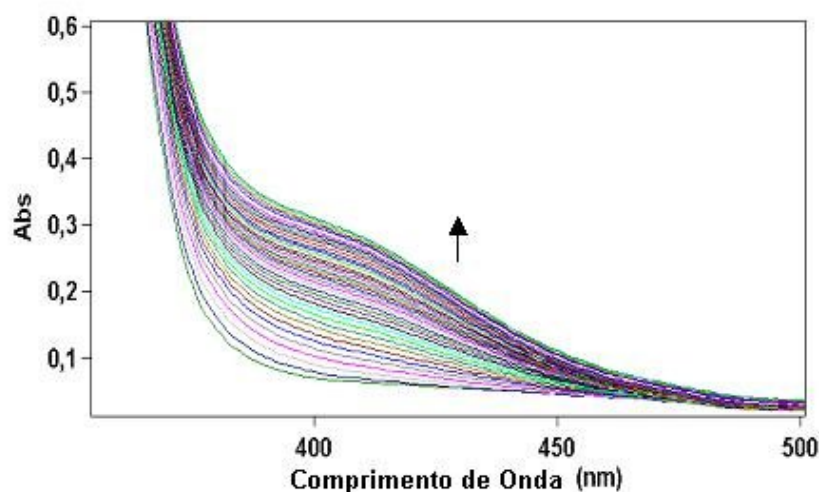


Figura 8 Variação da absorbância em função do comprimento de onda da mistura reacional de $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH em H_2O , $\mu = 1,0$ (KCl) e $\text{pH} = 10,25$ a 25°C .

A **Figura 9** apresenta a variação do aumento de absorbância em função do tempo, em 400 nm, para a reação do DNPEP com ABH. O perfil da curva é típico de cinética de primeira ordem em relação ao substrato.

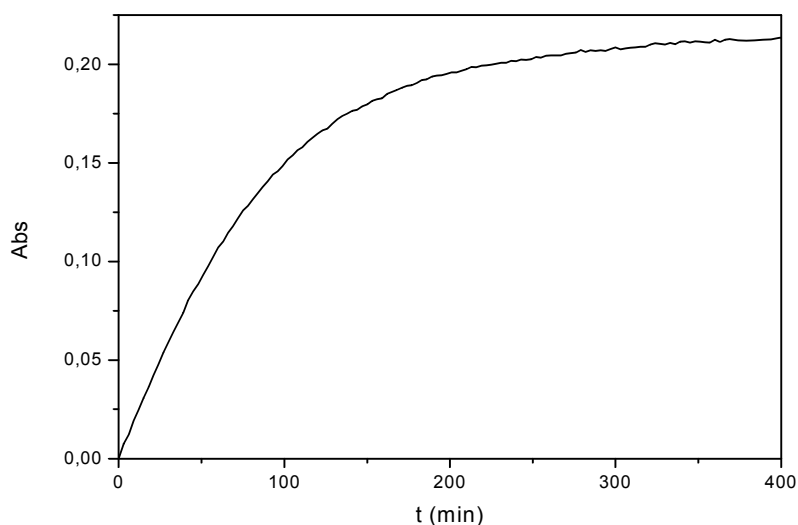


Figura 9 Variação da absorbância em função do tempo em 400 nm da mistura reacional de $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH em H_2O , $\mu = 1,0$ (KCl) e $\text{pH} = 10,25$ a 25°C .

4.2.1. Determinação das constantes de velocidade para a reação do DNPEP e ABH.

O efeito do aumento na concentração de ABH nas constantes de velocidade observadas na reação com o DNPEP está apresentado na **Figura 10** e os dados estão na **Tabela 1**. O perfil apresentado mostra a dependência linear da concentração de ABH com as constantes observadas, na faixa estudada e indica a promoção da velocidade da reação pelo ABH.

Tabela 1 Constantes de velocidades observadas em função da concentração de ABH para a reação em pH = 10,25, $\mu = 1,0$ (KCl) a 25 °C.

[ABH] , mol L ⁻¹	10 ⁴ <i>k</i> _{obs} , s ⁻¹
0,010	0,27
0,015	0,42
0,035	0,83
0,045	1,09
0,050	1,19
0,055	1,23
0,065	1,39
0,070	1,48
0,075	1,59
0,080	1,66
0,090	1,78
0,100	2,08

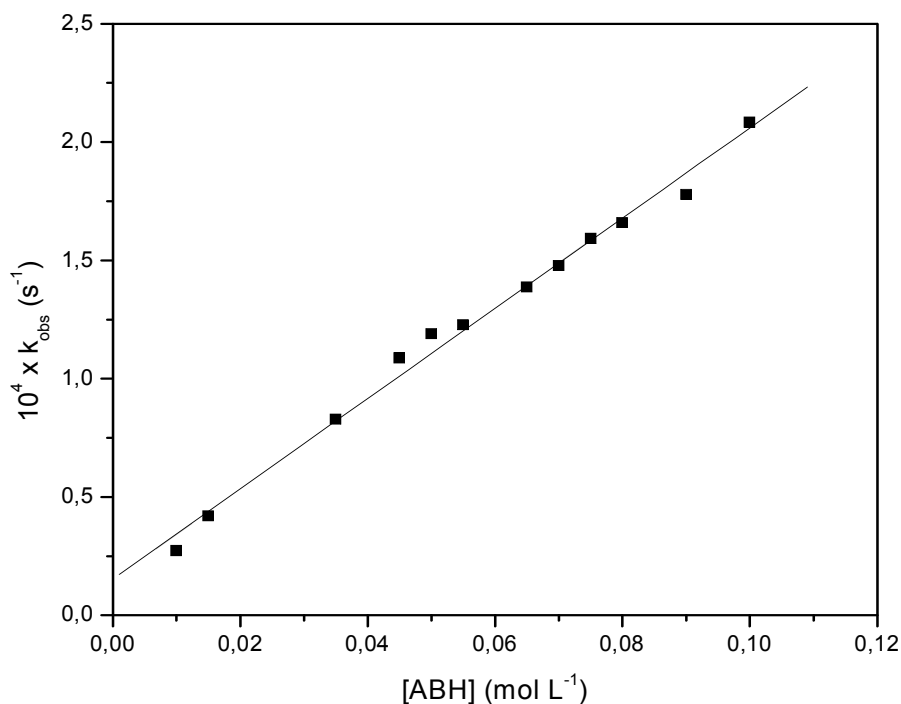


Figura 10 Constantes de velocidades observadas em função da concentração de ABH na reação com DNPEP em H₂O, $\mu = 1,0\text{M}$ (KCl), pH = 10,25 a 25°C.

Os dados da **Figura 10** foram ajustados de acordo com a **Equação (2)**, e os valores obtidos estão apresentados na **Tabela 2**.

$$k_{obs} = k_0 + k_{ABH}[ABH] \quad (2)$$

Onde k_0 corresponde à constante de velocidade observada para a reação em água, e k_{ABH} à constante de velocidade de segunda-ordem para a reação na presença de ABH.

Tabela 2 Valores de k_0 e k_{ABH} para a reação do ABH com DNPEP em pH = 10,25, $\mu = 1,0$ (KCl) a 25 °C.

k_0	k_{ABH}	R
$1,54 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$1,91 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	0,996

4.2.2. Efeito do pH nas reações entre ABH e DNPEP

A **Figura 11** mostra perfil cinético em função de pH (pH 6,0-11,0) para a reação entre o DNPEP e o ABH. A linha pontilhada corresponde à fração molar de ABH aniônico. Analisando a **Figura 11**, observa-se um aumento da constante de velocidade com o aumento do pH, evidenciando que a forma mais reativa do ABH é a deprotonada, **Esquema 7**.

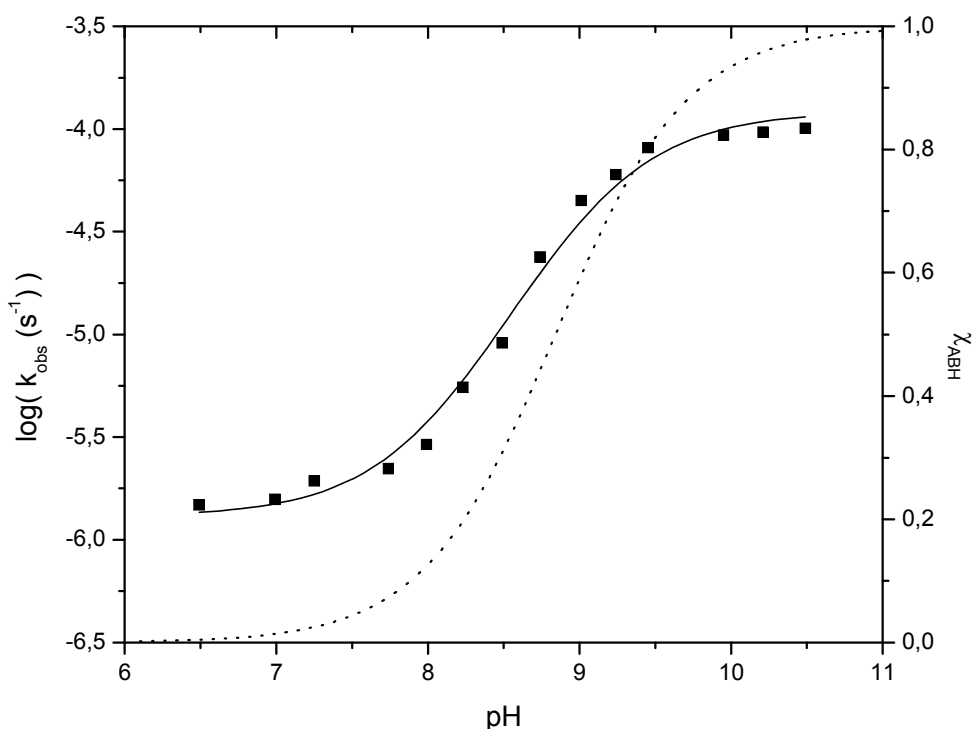
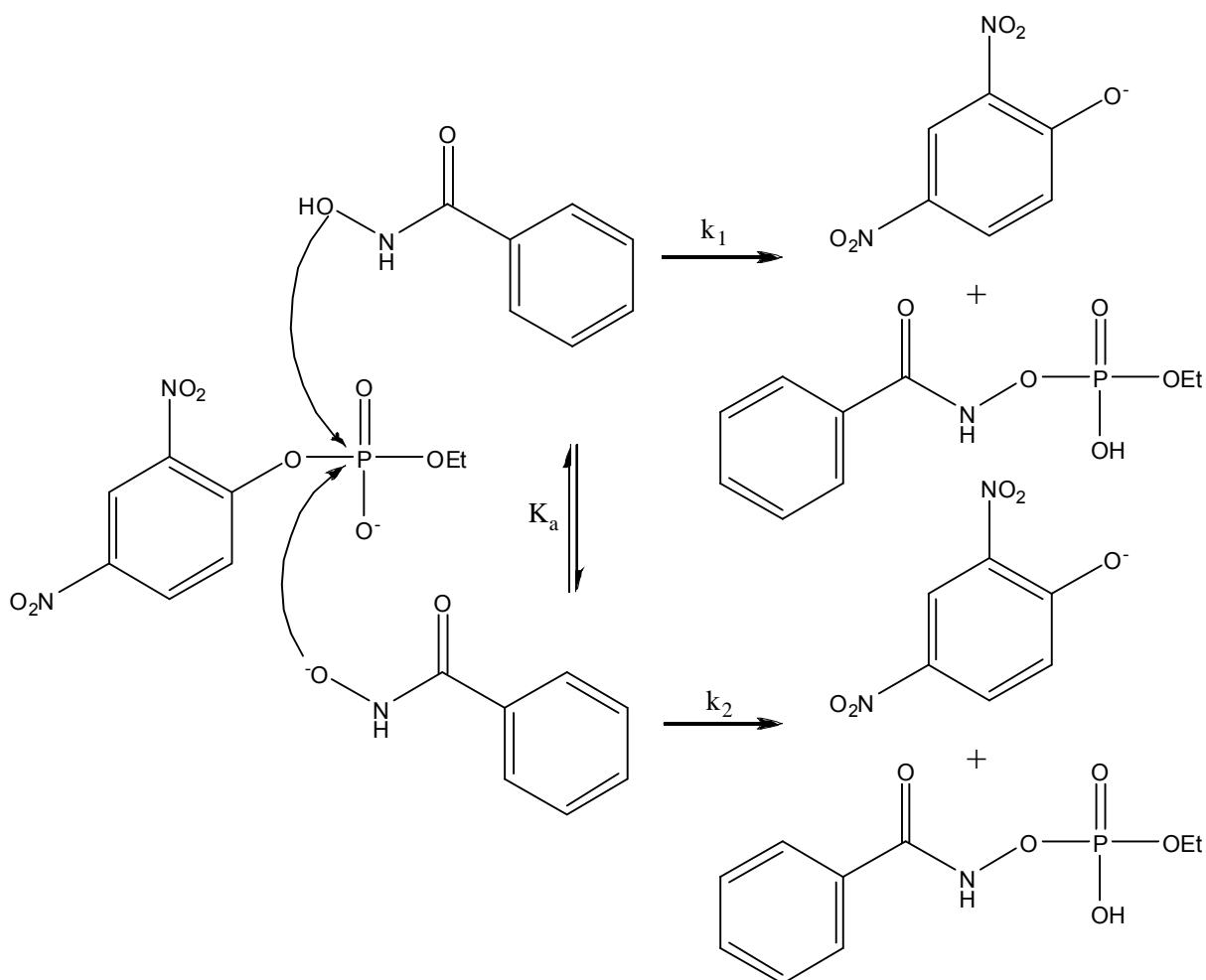


Figura 11 Gráfico do logaritmo de k_{obs} para a reação de $1,86 \times 10^{-5}$ M DNPEP com 0,05 M ABH em H_2O a 25 °C. A linha pontilhada corresponde à fração molar de ABH aniônico. A linha sólida foi gerada através do ajuste iterativo dos pontos experimentais usando a **Equação (4)**.



Esquema 7

A linha teórica foi obtida através do ajuste não linear utilizando a **Equação (3)** baseada no **Esquema 7**. Os valores dos parâmetros da equação obtidos através do ajuste estão apresentados na **Tabela 3**.

$$k_{\text{obs}} = k_o + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_1\chi_{\text{ABH}} + k_2\chi_{\text{ABH}^-} \quad (3)$$

A **Equação (3)** leva em consideração a hidrólise espontânea do DNPEP (k_o), a hidrólise catalisada pela espécie OH^- (k_{OH}) e a hidrólise catalisada pelas formas neutra (k_1) e aniônica (k_2) do ABH. Expressando as frações molares do ABH de em função da concentração, obtém-se a **Equação (4)**, onde K_a é a constante de dissociação do ABH.

$$k_{\text{obs}} = k_o + k_{\text{OH}^-}[\text{OH}^-] + \frac{k_1[\text{ABH}][\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} + \frac{k_2 K_a [\text{ABH}]}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (4)$$

Tabela 3 Parâmetros obtidos pelo ajuste da curva do gráfico do perfil cinético da reação do ABH com DNPEP em função do pH.

Constantes	
k_o, s^{-1}	$1,0 \times 10^{-9}$
$k_{\text{OH}^-}, \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$2,5 \times 10^{-4}$
$k_1, \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-5}$
$k_2, \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$2,2 \times 10^{-3}$
$\text{p}K_a$	9,2
R	0,994

Analisando a **Tabela 3**, observa-se que o valor de $\text{p}K_a$ cinético obtido através do ajuste (9,2) está próximo do valor obtido por titulação (8,84). Ainda, as constantes de velocidades obtidas mostram que a espécie OH^- não influencia significativamente na faixa de pH estudada. O alto valor de k_2 é consistente com o aumento na velocidade da reação de transferência do grupo fosforila do DNPEP em função do pH, devido a presença crescente da espécie deprotonada do ABH. Como seria esperado, a espécie neutra do ABH apresenta pouca influência na velocidade da reação estudada, dado o baixo valor de k_1 .

4.2.3 Efeito isotópico na reação do ABH e DNPEP

As constantes de velocidades observadas para a determinação do efeito do isotópico, foi obtida em H_2O a pH 10,25 e em D_2O a pD 10,25. Os valores das constantes obtidas e da relação $k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$ são apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 Valores de k_{obs} obtidos em H_2O e D_2O , e efeito isotópico ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$) para as reações entre ABH e DNPEP, $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH a 25 °C, pH 10,25 e pD 10,25.

$k_{\text{H}_2\text{O}}, \text{M s}^{-1}$	$1,51 \times 10^{-3}$
$k_{\text{D}_2\text{O}}, \text{M s}^{-1}$	$1,05 \times 10^{-3}$
$k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$	1,44

O valor obtido de efeito isotópico indica que provavelmente a reação acontece via ataque nucleofílico do oxigênio do ABH ao átomo de fósforo do DNPEP, já que para uma reação com catálise básica geral o efeito isotópico observado deve ser um pouco maior, geralmente em torno de 2,7.

4.2.4 Estudo do efeito da temperatura na reação do ABH e DNPEP

A dependência da velocidade da reação com a temperatura para a reação do ABH e DNPEP pode ser observada na **Figura 12**.

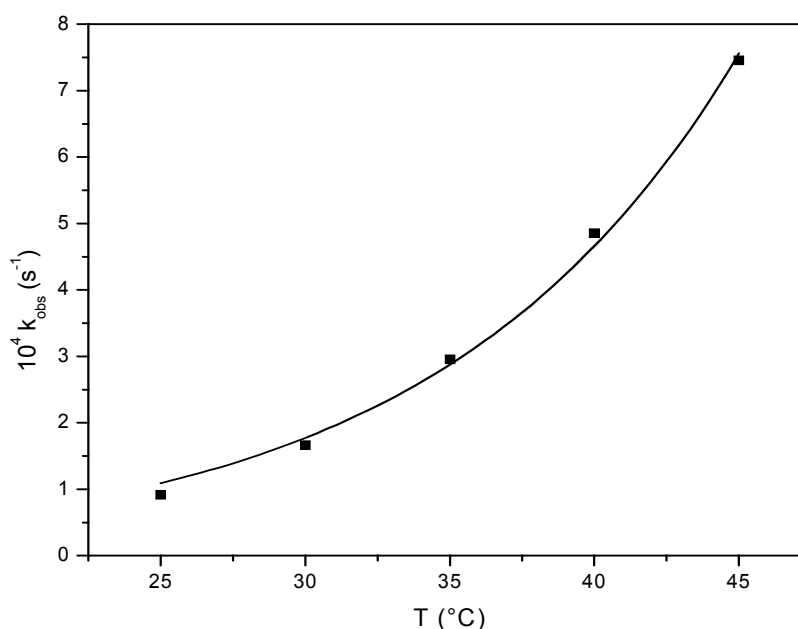


Figura 12 Relação entre a constante de velocidade com a temperatura da reação para $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP com 0,05 M de ABH, $\mu = 1,0$ M (KCl),

Os parâmetros de ativação da reação do ABH com DNPEP foram calculados a partir da equação de Eyring¹¹ (**Equação 5**). Essa equação lineariza a constante de

velocidade com temperatura e fornece os valores da entalpia e entropia de ativação através dos coeficientes angular e linear. Os valores usados para as constantes foram: k_B (constante de Boltzmann) $1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$; h (constante de Planck) $6,63 \times 10^{-34} \text{ J s}$ e R (constante universal dos gases) $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Os dados de energia de ativação (E_a) e energia livre de ativação (ΔG^\ddagger) foram calculados a partir das **Equações (6)** e **(7)**. A **Tabela 5** mostra os parâmetros da equação, determinados através do ajuste dos dados mostrados na **Figura 13**.

$$\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right) = \left[\ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \right] - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T}\right) \quad (5)$$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT \quad (6)$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (7)$$

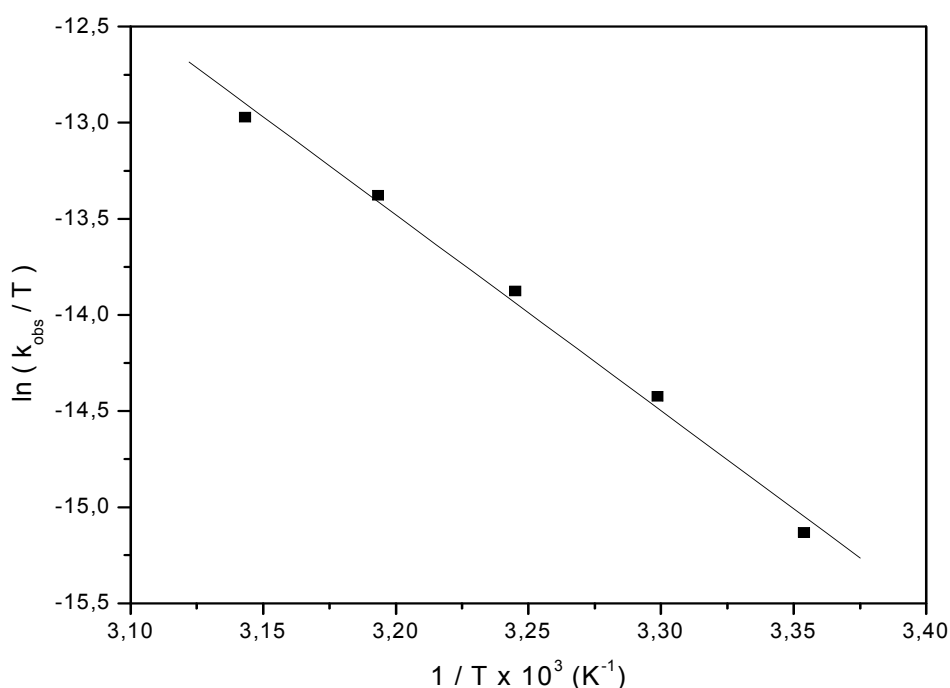


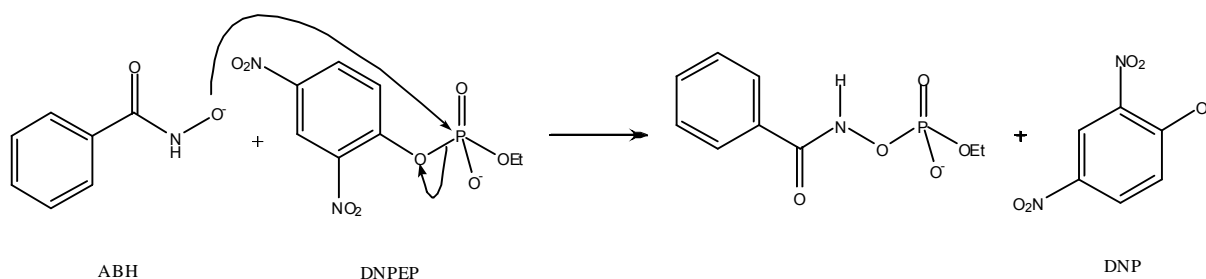
Figura 13 Variação de $\ln(k_{obs}/T)$ vs $1/T$ para a reação de $1,86 \times 10^{-5} \text{ M}$ de DNPEP com $0,05 \text{ M}$ de ABH, $\mu = 1,0 \text{ M}$ (KCl). $R = 0,998$.

Tabela 5 Parâmetros de ativação da reação de $1,86 \times 10^{-5}$ M de DNPEP e 0,05 M de ABH, $\mu = 1,0$ (KCl).

Parâmetros de ativação	
E_a (25 °C)	20,85 kcal mol ⁻¹
ΔH^\ddagger	20,26 kcal mol ⁻¹
ΔS^\ddagger	-9,16 eu
ΔG^\ddagger	23,0 kcal mol ⁻¹

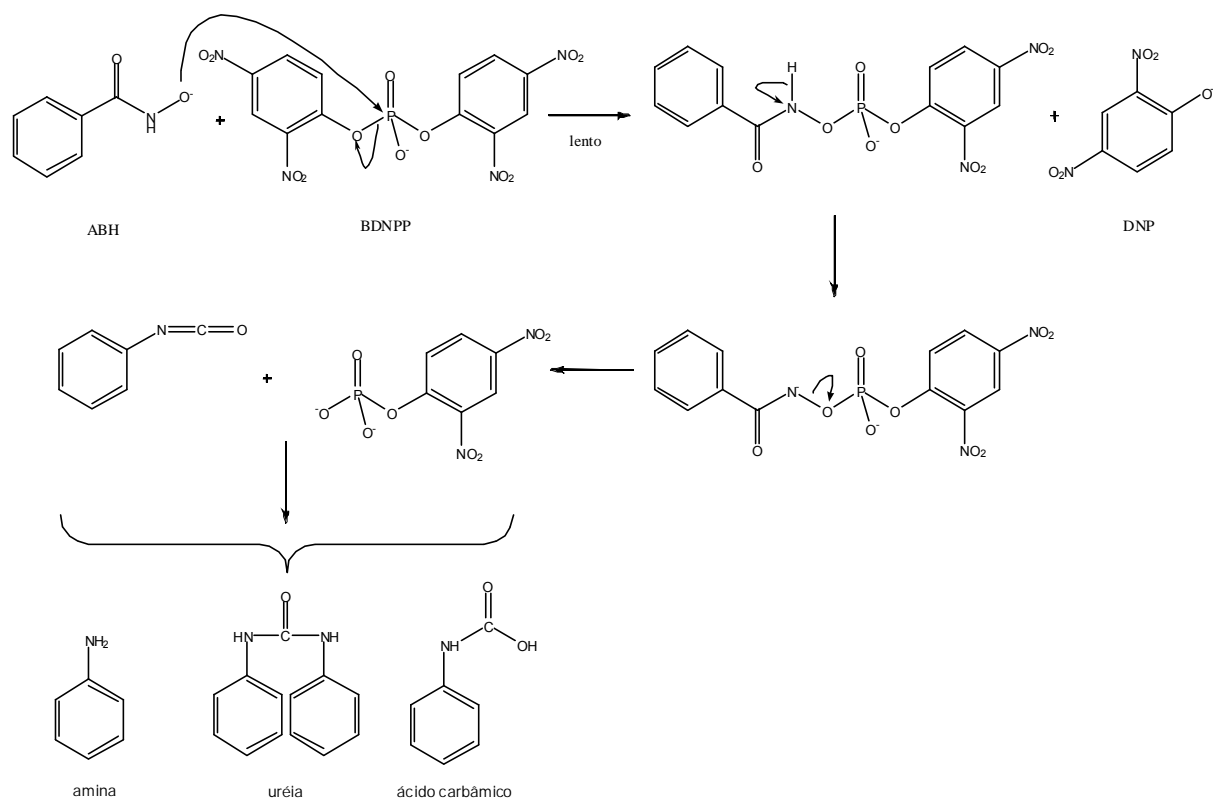
Os parâmetros termodinâmicos de ativação estão de acordo com os esperados para diésteres fosfóricos arílicos: $\Delta H^\ddagger \sim 20 - 30$ kcal mol⁻¹ e $\Delta S^\ddagger < 0$, indicando reações bimoleculares com um estado de transição altamente hidratado (devido a entropia de ativação negativa).⁶

Sugere-se que a reação do DNPEP e ABH deve seguir o **Esquema 8**, onde o oxigênio do α -nucleófilo alfa, ABH, ataca o fósforo do DNPEP formando produto (3).



Esquema 8

De fato, esse esquema reacional está de acordo com os resultados obtidos para a reação de um diéster similar, o bis (2,4-dinitrofenil) fosfato (BDNPP) com ABH.¹⁹ Evidenciou-se através de estudos de espectrometria de massa que essa reação segue o **Esquema 9**, onde há a formação do produto proposto no **Esquema 8**, no entanto esse se forma como intermediário na reação, pois sofre um rearranjo de Lossen formando isocianato, uréia, amina e ácido carbâmico. Assim, sugere-se que o mecanismo da reação do DNPEP com ABH deve ser similar ao da reação do BDNPP, passando por um rearranjo de Lossen.



Esquema 9

O estudo da hidrólise do DNPEP promovida por ABH se mostrou eficiente, evidenciando o efeito α dos ácidos hidroxâmicos através da constante de velocidade da reação e dos dados que indicam ataque nucleofílico do oxigênio do ABH sobre o fósforo do DNPEP.

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi estudada a reação do DNPEP com ABH, onde se observou:

- (i) uma dependência linear para o efeito da concentração de ABH sobre as constantes de velocidade observadas (k_{obs}).
- (ii) um efeito isotópico ($k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$) de 1,44 que é consistente com ataque nucleofílico.
- (iii) os parâmetros de ativação, $\Delta H^\ddagger = 20,26 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = -9,16 \text{ eu}$, típicos de uma reação bimolecular com um estado de transição altamente hidratado.

O aumento da velocidade da reação foi o esperado para o ataque de um nucleófilo que apresenta o efeito α sendo importante para o entendimento da hidrólise dos ésteres fosfóricos.

Sugere-se que a reação do DNPEP com ABH deve ocorrer com um ataque nucleofílico do oxigênio aniônico do ABH sobre o fósforo do DNPEP, formando um intermediário que sofre rearranjo de Lossen.

6 REFERÊNCIAS

- ¹ BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**. 5 ed. New York: W. H. Freeman, 2002, p. 1059.
- ² BLAU, L.; MENEGON, R. F.; CHUNG, M. C. Pró-Fármaco Ativado por Enzima, uma Estratégia Promissora na Quimioterapia. **Química Nova**, v. 29, n. 6, 2006.
- ³ CARRERAS E.; CARRERAS, M.; MUÑOS, J.; MALLOL, J. Phosphate Diesters for Dermatological Use. **Int. J. Cosm. Sci.**, v. 6, n 4, p. 159-166, 1984.
- ⁴ BENSCHOP, H. P; DE JONG, L. P. A. Nerve Agents Stereoisomers: Analysis, Isolation and Toxicology. **Acc. Chem. Res.**, v. 21, p. 368-371, 1988.
- ⁵ WANG, A. A.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Detoxification of Organophosphate Nerve Agents by Immobilized Dual Functional Biocatalysts in a Cellulose Hollow Fiber Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 3, p. 379-386, 2005.
- ⁶ KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. T. The Reactivity of Phosphate Esters. Diesters Hydrolysis. **J. Chem. Soc. B**. n. 6, p. 510-513, 1970.
- ⁷ KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. T. The Reactivity of Phosphate Esters. Reactions of Diesters with Nucleophiles. **J. Chem. Soc. B**. p. 1165-1171, 1970.
- ⁸ COX, J.R.; RAMSAY; O. B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate esters. **Chem. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 317-352, 1964.
- ⁹ FLORIÁN, J; WARSHEL, A. Phosphate Ester Hydrolysis in Aqueous Solution: Associative Versus Dissociative Mechanisms. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, p. 719-734, 1998.

- ¹⁰ ATKINS, P. W. **Physical Chemistry**. 6 ed. Oxford: Oxford University Press, 1998, p. 807.
- ¹¹ MASKIL, H. **Structure and Reactivity in Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press, 1999.
- ¹² Gajda, T. et al. Highly Efficient Phosphodiester Hydrolysis Promoted By a Dinuclear Copper(II) Complex. **Inorg. Chem.**, v. 40, p. 4918-4927, 2001.
- ¹³ SUROVA, T. V.; ENYASHIN, A. N. Tautomerism and Acidic Properties of N-Unsubstituted Benzohydroxamic Acids: Semiempirical Quantum Chemical Estimation. **J. Struct. Chem.**, v. 44, n. 2, p. 297-300, 2003.
- ¹⁴ BERNDT, D. C.; FULLER, R. L. The Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of Benzohydroxamic Acid. **J. Org. Chem.**, v. 31, n. 10, p. 3312-3314, 1966.
- ¹⁵ EDWARDS, J. O.; PEARSON, R. G. The Factors Determining Nucleophilic Reactivities. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 84, n. 1, p. 16-24, 1962.
- ¹⁶ DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v. 26, p. 745-453, 2003.
- ¹⁷ MOSS, R. A.; IHARA, Y. Cleavage of Phosphate Esters by Hydroxyl-Functionalized Micellar and Vesicular Reagents. **J. Org. Chem.**, v. 48, p. 588-592, 1983.
- ¹⁸ FIFE, T. H.; BRUICE, T. C. The temperature dependence of the ΔpD correction for the use of the glass electrode in D_2O . **J. Phys. Chem.**, v. 65, n. 6, p. 1079-1080, 1961.

¹⁹ MELLO, R.M.; ORTH, E.S. NOME, F. Estudo Mecanístico da Reação do Ácido Benzohidroxâmico com o Diéster Bis-(2,4-Dinitrofenil) Fosfato. Trabalho apresentado na **31 Reunião Anual da SBq**, Águas de Lindóia, 2008.